

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19)世界知的所有権機関
国際事務局



(43)国際公開日
2001年6月28日 (28.06.2001)

PCT

(10)国際公開番号
WO 01/46414 A1

(51)国際特許分類: C12N 15/12, 145, 1/19, 1/21, 5/10, C07K 14/705, C12P 21/02, C12Q 1/02, C07K 16/28

太田雅貴 (OHTA, Masataka) [JP/JP], 〒300-2611 茨城県つくば市大久保3番地 萬有製薬株式会社 つくば研究所内 Ibaraki (JP).

(21)国際出願番号: PCT/JP00/09038

(74)代理人: 清水初志、外 (SHIMIZU, Hatsuhi et al.), 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (JP).

(22)国際出願日: 2000年12月20日 (20.12.2000)

(81)指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AI, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(25)国際出願の言語: 日本語

(84)指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ヨーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(26)国際公開の言語: 日本語

添付公開書類:
-- 国際調査報告書

/続葉有/

(54)Title: NOVEL GUANOSINE TRIPHOSPHATE-BINDING PROTEIN-COUPLED RECEPTOR PROTEIN, BG26

(54)発明の名称: 新規なグアノシン三リン酸結合タンパク質共役型のレセプタータンパク質、BG26

(57)Abstract: A gene encoding a novel G protein-coupled receptor protein showing a significant homology with histamine H3 is successfully isolated. The protein encoded by this gene has an activity of binding to histamine and thus changing the intracellular cAMP concentration in response to the stimulus thereof. This G protein-coupled receptor protein is usable as a tool in screening its ligand or in screening a candidate for a drug capable of regulating the signal transduction from this protein.

(57)要約:

ヒスタミン H3 に有意な相同意を示す新規な G タンパク質共役型レセプタータンパク質をコードする遺伝子を単離することに成功した。該遺伝子によりコードされるタンパク質は、ヒスタミンに結合し、その刺激に応答して細胞内の cAMP 濃度を変化させる活性を有していた。本発明の G タンパク質共役型レセプタータンパク質は、そのリガンドのスクリーニングや該タンパク質からのシグナル伝達を調節しうる医薬品候補化合物のスクリーニングのためのツールとして利用しうる。

WO 01/46414 A1



2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明細書

新規なグアノシン三リン酸結合タンパク質共役型の
レセプタータンパク質、BG 2 6技術分野

本発明は、新規なグアノシン三リン酸結合タンパク質共役型のレセプタータンパク質、該タンパク質をコードするDNA、並びにこれらを利用した医薬品候補化合物のスクリーニング方法に関する。

背景技術

多くのホルモンや神経伝達物質は細胞膜に存在する特異的なレセプタータンパク質を通じて生体の機能を調節している。これらのレセプタータンパク質の多くは共役しているグアノシン三リン酸結合タンパク質(以下、「Gタンパク質」と略称する場合がある)の活性化を通じて細胞内のシグナル伝達を行なっている。このため、このレセプタータンパク質はGタンパク質共役型レセプタータンパク質と総称されている。あるいは7個の膜貫通領域を有する共通した構造をもっていることから、7回膜貫通型レセプタータンパク質とも総称されている。

Gタンパク質共役型レセプタータンパク質は生体の細胞や臓器の各機能細胞表面に存在し、それら生体の細胞や臓器の機能を調節する分子、例えばホルモン、神経伝達物質および生理活性物質等の標的として非常に重要な役割を担っている。このため、Gタンパク質共役型レセプタータンパク質は医薬品開発の標的として非常に注目されている。

Gタンパク質共役型レセプタータンパク質としては、これまでにムスカリノン性アセチルコリン・レセプターM1、M2、M3、M4 (Peralta, E.G. et al., *EMBO J.* 6, 3923-3929 (1987))、ムスカリノン性アセチルコリン・レセプターM5 (Bonner,

T.I. et al., *Neuron* 1, 403-410 (1988)）、アデノシン・レセプターA1 (Libert,F. et al., *Science* 244, 569-572 (1989))、 α 1Aアドレノレセプター (Bruno,J.F. et al., *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 179, 1485-1490 (1991))、 β 1アドレノセプター (Frielle,T. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 84, 792 0-7924 (1987))、アンジオテンシン・レセプターAT1 (Takayanagi,R., et al., *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 183, 910-916 (1992))、エンドセリン・レセプターETA (Adachi,M. et al., *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 180, 1265-1 272 (1991))、ゴナドトロピン放出因子レセプター (Kaker,S.S. et al., *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 189, 289-295 (1992))、ヒスタミン・レセプターH2 (Ruat,M. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 87, 1658-1672 (1992))、神経ペプチドYレセプターY1 (Larhammar,D. et al., *J.Biol.Chem.* 267, 10935-10 938(1992))、インターロイキン8・レセプターIL8RA (Holmes,W.E. et al., *Science* 2563, 1278-1280 (1991))、ドーパミン・レセプターD1 (Mahan,L.C. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 87, 2196-2200 (1990))、代謝型グルタミン酸レセプター mGluR1 (Masu M. et al., *Nature* 349, 760-765 (1991))、ソマトスタチン・レセプターSS1 (Yamada Y. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 89, 251-255) などが報告されている（参考文献：Watson,S. and Arkinstall, S., *The G-Protein Linked Receptor FactsBook*, Academic Press (1994))。また、Gタンパク質共役型レセプタータンパク質を標的とした医薬品としては、塩酸テラゾシン（血圧降下剤、 α 1アドレノセプター・アンタゴニスト）、アテノロール（不整脈用剤、 β 1アドレノセプター・アンタゴニスト）、塩酸ジサイクロミン（鎮痙剤、アセチルコリン・レセプター・アンタゴニスト）、塩酸ラニチジン（消化性潰瘍治療剤、ヒスタミン・レセプターH2・アンタゴニスト）、塩酸トラゾドン（抗うつ剤、セロトニン・レセプター5-HT1B・アンタゴニスト）、塩酸ブブレノルフィン（鎮痛剤、オピオイド・レセプター κ ・アゴニスト）、塩酸ブブレノルフィン（鎮痛剤、オピオイド・レセプター κ ・アゴニスト）。

ト）などが開発されている（参考文献：Stadel.J.M. et al., Trends Pharm. Sci. 18, 430-437 (1997)；医薬品要覧第5版、薬業時報社）。

発明の開示

本発明は、ヒスタミン刺激に応答する新規な G タンパク質共役型レセプタータンパク質を提供する。さらに、本発明は、該レセプタータンパク質を利用したリガンドおよび医薬品の候補化合物のスクリーニング方法を提供する。

本発明者らは、上記課題を解決するために、まず、複数の既知の GPCR の配列情報を利用したデーターベース検索を行ない、既知の GPCR と類似性を示した配列をリストアップし、その中からヒスタミンレセプターH3 と部分的に類似性を示す新規な GPCR をコードすると考えられる 1 つの配列 (AC007922) を見出した（この新規 GPCR 候補遺伝子を「BG26」と命名した）。このblast 検索では、AC 007922 塩基配列の中に、ヒスタミンレセプターH3 の第 2 膜貫通領域より N 末端部位に対応する配列を見出せなかつたため、次ぎに、より精度の高い **fasta** を利用して、ヒスタミンレセプターH3 と AC007922 との比較を行ない、BG26 の N 末端部分らしい配列を見出した。

全長 BG26 cDNA を単離するために、本発明者等は、次ぎに、BG26 の開始コドンの 5' 側および終始コドンの 3' 側の配列を基にプライマーを設計し、ヒト白血球 cDNA を錆型にポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行なった。その結果、BG26 をコードする全長 cDNA を単離することに成功した。BG2 タンパク質は 390 残基のアミノ酸配列からなり、ヒスタミンレセプターH3 と有意な相同意を示した。

RT-PCR により BG26 の発現を検出した結果、BG26 は、心臓、腎臓、肝臓、脾臓、胎盤、骨格筋、抹消血白血球、前立腺、小腸、脾臓、睾丸、骨髓、およびリンパ節で発現が検出された。

また、BG26 が実際にヒスクミンとの結合活性を有するか否かを確認するために、BG26 を発現させた細胞の膜画分を調製し、該膜画分に対する N- α -メチル

ヒスタミンの結合を解析した。その結果、膜画分用量依存的に N - α -メチルヒスタミンの特異的結合が上昇することを見出した。このことから、BG26 はヒスタミンアナログと結合することが明かとなった。

さらに、本発明者等は、BG26 がヒスタミン刺激に応答して細胞内 cAMP 濃度を変化させるか否かを解析するために、外来性の BG26 を発現させた細胞に対し、ヒスタミン刺激を行ない、その後の細胞内 cAMP 濃度の変化の検出を行なった。その結果、BG26 を発現させた細胞では、ヒスタミン濃度に依存的に cAMP 濃度が減少することが確認された。これにより、BG26 が、 $G\alpha i$ に共役しヒスタミン特異的に cAMP を減少させる活性を有することを明らかにした。

本発明者等により見出された BG26 は、このような BG26 の機能を調節するアゴニストやアンタゴニストのスクリーニングにおいて非常に有用なツールとなり、これらアゴニストやアンタゴニストには医薬品としての利用が期待される。

本発明は、ヒスタミンと結合する新規な G タンパク質共役型のレセプタータンパク質およびその遺伝子、並びにそれらの用途、特に医薬品候補化合物のスクリーニングのための用途に関する。

より具体的には、本発明は、

(1) 下記 (a) から (d) のいずれかに記載のグアノシン三リン酸結合タンパク質共役型のレセプタータンパク質をコードする DNA、

(a) 配列番号：2 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする DNA。

(b) 配列番号：1 に記載の塩基配列のコード領域を含む DNA。

(c) 配列番号：2 に記載のアミノ酸配列において 1 もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入されたアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする DNA。

(d) 配列番号：1 に記載の塩基配列からなる DNA とストリンジエントな条件下ハイブリダイズする DNA。

(2) ヒスタミンとの結合活性を有するタンパク質をコードする、(1)に記載の DNA、

(3) ヒスタミン刺激に応答して細胞内の cAMP 濃度を変化させる活性を有するタンパク質をコードする、(1)に記載の DNA、

(4) 配列番号：2 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質の部分ペプチドをコードする DNA、

(5) (1) から (4) のいずれかに記載の DNA を含むすることを特徴とするベクター、

(6) (1) から (4) のいずれかに記載の DNA または (5) に記載のベクターを保持する形質転換体、

(7) (1) から (4) のいずれかに記載の DNA によりコードされるタンパク質またはペプチド、

(8) (6) に記載の形質転換体を培養し、発現させたタンパク質又はペプチドを回収する工程を含む、(7) に記載のタンパク質またはペプチドの製造方法、

(9) (7) に記載のタンパク質に結合するリガンドまたはそのアナログのスクリーニング方法であって、

(a) (7) に記載のタンパク質またはペプチドに被検化合物を接触させる工程、

(b) 該タンパク質またはペプチドに結合する化合物を選択する工程、を含む方法、

(10) (7) に記載のタンパク質とそのリガンドまたは該リガンドのアナログとの結合を阻害する活性を有する化合物のスクリーニング方法であって、

(a) 被検化合物の存在下で (7) に記載のタンパク質またはペプチドにリガンドまたはそのアナログを接触させ、該タンパク質またはペプチドとリガンドまたはそのアナログとの結合活性を検出する工程、

(b) 被検化合物非存在下での結合活性と比較して、工程 (a) で検出された結合活性を低下させる化合物を選択する工程、を含む方法、

(11) リガンドがヒスタミンである、(10) に記載の方法、

(12) (7) に記載のタンパク質の活性を阻害または促進する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 被検化合物の存在下で該タンパク質を発現する細胞に該タンパク質のリガンドまたはそのアナログを接触させる工程、

(b) 該リガンドまたはそのアナログの該タンパク質への結合による細胞における変化を検出する工程、

(c) 被検化合物非存在下での細胞における変化と比較して、工程 (b) で検出された細胞における変化を抑制または増強させる化合物を選択する工程、を含む方法、

(13) リガンドがヒスタミンである、(12) に記載の方法、

(14) 検出する細胞における変化が、cAMP 濃度の変化、カルシウム濃度の変化、G タンパク質の活性化、ホスホリバーゼ C の活性化、および pH の変化からなる群より選択される、(12) または (13) に記載の方法、

(15) (7) に記載のタンパク質またはペプチドを含有することを特徴とする、(9) から (14) のいずれかのスクリーニングのためのキット、

(16) (7) に記載のタンパク質に結合する抗体、

(17) (10) から (14) のいずれかに記載のスクリーニングにより単離される化合物、および

(18) (17) に記載の化合物を有効成分とする医薬組成物、を提供するものである。

なお、本発明において「G タンパク質共役型のレセプタータンパク質」とは、G タンパク質の活性化を通じて細胞内のシグナル伝達を行なっているレセプタータンパク質を指す。

本発明において「リガンド」とは、Gタンパク質共役型のレセプタータンパク質に結合して、シグナル伝達を誘導する能力を有する天然の化合物を指す。「リガンドのアナログ」とは、Gタンパク質共役型のレセプタータンパク質に結合するリガンドと同様の生理活性を有するか、もしくはリガンドの生理活性を抑制するリガンドの誘導体を指し、天然の化合物および人工的に合成された化合物の双方が含まれる。例えば、ヒスタミンとR(-)- α -メチルヒスタミンは、リガンドとそのアナログの関係にある。

本発明において「アゴニスト」とは、Gタンパク質共役型のレセプタータンパク質のリガンドと同様の生理活性を有する化合物を指し、天然の化合物および人工的に合成された化合物の双方が含まれる。

本発明において「アンタゴニスト」とは、Gタンパク質共役型のレセプタータンパク質のリガンドの生理活性を抑制する能力を有する化合物を指し、天然の化合物および人工的に合成された化合物の双方が含まれる。

本発明における「タンパク質」および「ペプチド」にはその塩も含まれる。

本発明は、新規なGタンパク質共役型レセプタータンパク質「BG26」に関する。本発明者等により単離されたヒト由来「BG26」cDNAの塩基配列を配列番号：1に、該cDNAによりコードされる「BG26」タンパク質のアミノ酸配列を配列番号：2に示す。

ヒト「BG26」cDNAは、公知のG蛋白質共役型レセプター蛋白質であるヒスタミンH3と有意な相同性を有する390アミノ酸残基からなるタンパク質をコードする。この事実は「BG26」タンパク質が、そのリガンドの作用によりG蛋白質の活性化を通じてシグナル伝達を行っていることを示唆する。実際に、ヒト「BG26」タンパク質はヒスタミンに結合する活性を有し、また、ヒスタミンの刺激に応答して細胞内のcAMP濃度を低下させる活性を有していた。本発明の「BG26」タンパク質やその活性を調節する化合物（アゴニストやアンタゴニスト）には、「BG26」タンパク質の活性や発現の異常に起因する疾患の治療や予防のた

めに利用し得る。対象となる疾患の候補としては、例えば、関節リュウマチ、変形性関節症、胃潰瘍、炎症性腸疾患、虚血性心疾患、不整脈、高及び低血圧症、肥満、喘息、疼痛、アレルギー疾患、自己免疫疾患 (Trends in Pharmacological Science, vol 19, 1998, 177-183, Stark, H. et al., Drugs of the Future 21, 507-520 (1996)、Onodera, K. and Watanabe, T., Jpn. J. Psychopharmacol. 1, 15, 87-102 (1995)) などが挙げられるが、これらに制限されない。

本発明は、また、ヒト「BG26」タンパク質と機能的に同等なタンパク質を提供する。このようなタンパク質は、当業者に公知のアミノ酸を改変する方法、例えば、Kunkel 法 (Kunkel, T.A. et al., Methods Enzymol. 154, 367-382 (1987))、ダブルプライマー法 (Zoller, M.J. and Smith, M., Methods Enzymol. 154, 329-350 (1987))、カセット変異法 (Wells, et al., Gene 34, 315-23 (1985))、メガプライマー法 (Sarkar, G. and Sommer, S.S., Biotechniques 8, 404-407 (1990)) などをを利用して調製することが可能である。即ち、当業者であれば、公知の方法を用いて天然型のヒト「BG26」タンパク質 (配列番号 : 2) 中のアミノ酸の置換などの修飾を行い、天然型のタンパク質と同等の機能または活性 (グアノシン三リン酸結合タンパク質の活性化を通じて細胞内のシグナル伝達を行なう機能、ヒスタミンとの結合活性、ヒスタミン刺激に応答して細胞内の cAMP 濃度を変化させる活性) を有する改変タンパク質を調製することが可能である。また、タンパク質のアミノ酸の変異は天然においても生じうる。このようにアミノ酸の置換、欠失、付加、挿入などにより天然型のタンパク質に対してアミノ酸配列が変異した変異体であって、天然型のタンパク質と同等の機能を有するタンパク質も本発明の G タンパク質共役型レセプタータンパク質に含まれる。機能的に同等なタンパク質におけるアミノ酸の変異数は、通常、全アミノ酸の 10%以内、好ましくは 10 アミノ酸以内、さらに好ましくは 3 アミノ酸以内 (例えば、1 アミノ酸) であると考えられるが、その機能が保持される限り、特に制限はない。

ヒト「BG26」タンパク質と機能的に同等なタンパク質は、また、当業者に公知のハイブリダイゼーション技術 (Hanahan, D. and Meselson, M., *Meth. Enzymol.* 100, 333-342 (1983)、Benton, W.D. and Davis, R.W., *Science* 196, 180-182 (1977)) を利用して調製することができる。即ち、当業者であれば、ヒト「BG26」cDNA 配列（配列番号：1）またはその一部を利用してハイブリダイゼーションを行ない、種々の他の生物からこれと相同意の高い DNA を単離し、さらに単離した DNA から「BG26」タンパク質と同等の機能を有するタンパク質を得ることができる。本発明には、ヒト「BG26」cDNA とハイブリダイズする DNA がコードするタンパク質であって、ヒト「BG26」タンパク質と機能的に同等なタンパク質もまた本発明の G タンパク質共役型レセプタータンパク質に含まれる。

ヒト「BG26」cDNA と相同意の高い DNA を単離するためのハイブリダイゼーションのストリンジエントな条件としては、ハイブリダイゼーションを「6 x SSC、40% ホルムアミド、25°C」、洗浄を「1 x SSC、55°C」で行う条件を用いることができる。より好ましい条件としては、ハイブリダイゼーションを「6 x SSC、40% ホルムアミド、37°C」、洗浄を「0.2 x SSC、55°C」で行う条件、さらに好ましい条件としては、ハイブリダイゼーションを「6 x SSC、50% ホルムアミド、37°C」、洗浄を「0.1 x SSC、62°C」で行う条件を用いることができる。なお、当業者であれば、SSC の希釀率、ホルムアミド濃度、温度などの諸条件を適宜選択することで、上記の条件と同様のストリンジエンシーのハイブリダイゼーション条件を実現することができる。

ハイブリダイゼーション技術を利用して機能的に同等なタンパク質を単離する他の生物としては、例えば、マウス、ラット、ウサギ、ウシ、イヌ、サルなどが挙げられるが、これらに制限はない。

ヒト「BG26」タンパク質と同等の機能を有するタンパク質をコードする DNA は、通常、ヒト「BG26」cDNA の塩基配列（配列番号：1）と高い相同意を有す

る。高い相同性とは、塩基レベルで少なくとも 70% 以上、好ましくは 80% 以上、さらに好ましくは 90% 以上（例えば、95% 以上）の配列の同一性を指す。配列の相同性は、FASTA プログラムを利用して決定することができる。

同様に、ポリメラーゼ連鎖反応などの遺伝子増幅技術を利用して、ヒト「BG26」タンパク質と機能的に同等なタンパク質を調製することも可能である。

本発明のタンパク質は、天然のタンパク質の他、遺伝子組み換え技術を利用した組換えタンパク質として調製することができる。天然のタンパク質は、例えば、ヒト「BG26」タンパク質が発現していると考えられる脳組織の抽出液に対し、後述する「BG26」抗体を用いたアフィニティクロマトグラフィーを行う方法により調製することが可能である。一方、組換えタンパク質は、後述するように本発明のタンパク質をコードする DNA で形質転換した細胞を培養することにより調製することが可能である。

また、本発明は、上記本発明の G タンパク質共役型レセプタータンパク質の部分ペプチドを包含する。本発明の部分ペプチドとしては、例えば、本発明の G タンパク質共役型レセプタータンパク質の N 末端領域の部分ペプチドが挙げられ、該ペプチドは抗体の調製に利用することができる。また、ヒスタミンとの結合活性を有するペプチドや細胞表面に発現させた場合にヒスタミン刺激に応答して細胞内 cAMP 濃度もしくはカルシウム濃度を変化させる活性を有するペプチドが挙げられ、これらペプチドは、後述する医薬品候補化合物のスクリーニングに利用することができる。また、ヒスタミンとの結合活性を有するが細胞内へのシグナル伝達を行なう活性を有しない部分ペプチドは、本発明の「BG26」タンパク質の競合阻害剤になり得る。このような本発明の部分ペプチドは、少なくとも 10 アミノ酸、好ましくは 15 アミノ酸、さらに好ましくは 20 アミノ酸以上の鎖長を有するポリペプチドである。

また、本発明は、上記本発明の G タンパク質共役型レセプタータンパク質またはその部分ペプチドをコードする DNA に関する。本発明の G タンパク質共役

型レセプタータンパク質やその部分ペプチドをコードする DNA としては、これらタンパク質や部分ペプチドをコードしうるものであれば特に制限はなく、cDNA、ゲノム DNA、および合成 DNA が含まれる。本発明の G タンパク質其役型レセプタータンパク質をコードする cDNA は、例えば、配列番号： 1 に記載の cDNA あるいはその断片、それらに相補的な RNA、または該 cDNA の配列の一部を含む合成オリゴヌクレオチドを ³²P などで標識し、本発明の G タンパク質其役型レセプタータンパク質が発現している組織由来の cDNA ライブラリーにハイブリダイズさせることによりスクリーニングすることができる。あるいは、これら cDNA の塩基配列に対応するオリゴヌクレオチドを合成し、適当な組織由来の cDNA を鉄型にポリメラーゼ連鎖反応により増幅し、クローニングすることもできる。ゲノム DNA は、例えば、配列番号： 1 に記載の cDNA あるいはその断片、それらに相補的な RNA、または該 cDNA の配列の一部を含む合成オリゴヌクレオチドを ³²P などで標識し、ゲノム DNA ライブラリーにハイブリダイズさせることによりスクリーニングすることができる。あるいは、これら cDNA の塩基配列に対応するオリゴヌクレオチドを合成し、ゲノム DNA を鉄型にポリメラーゼ連鎖反応により増幅し、クローニングすることもできる。一方、合成 DNA は、例えば、配列番号： 1 に記載の cDNA の部分配列を持つオリゴヌクレオチドを化学合成し、アニーリングさせて二本鎖にし、DNA リガーゼで結合させることにより調製することができる (Khorana, H. G. et al., J. Biol. Chem. 251, 565-570 (1976); Goeddel D. V. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 106-10 (1979))。

これら DNA は、組換えタンパク質の生産に有用である。即ち、上記本発明の G タンパク質其役型レセプタータンパク質をコードする DNA (例えば、配列番号： 1 に記載の DNA) を適当な発現ベクターに挿入し、該ベクターを適当な細胞に導入して得た形質転換体を培養し、発現させたタンパク質を精製することにより本発明の G タンパク質其役型レセプタータンパク質を組換えタンパク質として調製することが可能である。本発明の G タンパク質其役型レセプタータンパク質

はレセプタータンパク質であるため、細胞膜に発現させて調製することが可能である。

具体的には、宿主が大腸菌エシェリシア・コリ (*Escherichia coli*) の場合、プラスミドベクターpET-3 (Rosenberg,A.H. et al., *Gene* 56, 125-35 (1987))、pGEX-1 (Smith,D.B. and Johnson,K.S., *Gene* 67, 31-40 (1988)) などが用いられる。大腸菌の形質転換は、Hanahan 法 (Hanahan,D., *J.Mol.Biol.* 166, 557-580 (1983))、電気穿孔法 (Dower,W.J. et al., *Nucl.Acids Res.* 16, 6127-6145 (1988)) などで行う。宿主が分裂酵母シゾサッカロマイセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) の場合には、プラスミドベクターpESP-1 (Lu, Q. et al., *Gene* 200, 135-144 (1997)) などが用いられる。酵母の形質転換は、例えば、スフェロプラスト法 (Beach,D. and Nurse,P., *Nature* 290, 140 (1981))、酢酸リチウム法 (Okazaki,K. et al., *Nucleic Acids Res.* 18, 6485-6489 (1990)) などにより行なわれる。

一方、宿主がほ乳動物細胞、例えば、チャイニーズハムスター卵巣由来細胞 C3H0、ヒト HeLa 細胞などの場合、pMSG (クロンテク社) などのベクターが用いられる。ほ乳動物細胞への組換え DNA の導入は、リン酸カルシウム法 (Graham,F. L. and van der Eb,A.J., *Virology* 52, 456-467 (1973))、DEAE-デキストラン法 (Sussman,D.J. and Milman,G., *Mol.Cell.Biol.* 4, 1641-1643 (1984))、リポフェクション法 (Felgner,P.L. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U S A* 84, 7413-7417 (1987))、電気穿孔法 (Neumann,E. et al., *EMBO J.* 1, 841-845 (1982)) などで行なわれる。宿主が昆虫細胞の場合には、バキュロウイルスベクター-pBacPAK8/9 (クロンテク社) などが用いられる。昆虫細胞の形質転換は、例えば、バイオ／テクノロジー (Bio/Technology) ,6, 47-55 (1980)) などに記載の方法に従って行なうことができる。

宿主細胞において発現させた組換えタンパク質は、公知の方法により精製することができる。また、例えば、N 末端にヒスチジン残基のタグ、グルタチオン S

トランスフェラーゼ (GST) などを結合した融合タンパク質の形で合成し、金属キレート樹脂、GST 親和性レジンに結合させることにより精製することができる (Smith, M.C. et al., J.Biol.Chem. 263, 7211-7215 (1988))。例えば、ベクターとして pESP-1 を用いた場合、目的のタンパク質は、グルタチオン S トランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質として合成されるため、GST 親和性レジンに結合させることにより組換えタンパク質を精製できる。融合タンパク質から目的タンパク質を分離するには、例えば、トロンビン、血液凝固因子 Xa などで切断する。

本発明の G タンパク質共役型レセプタータンパク質をコードする DNA は、その変異に起因する疾患の遺伝子治療に応用することも考えられる。遺伝子治療に用いる場合には、ヒト細胞への遺伝子導入には、レトロウイルスベクター (Danos, O. and Mulligan, R.C., Proc.Natl.Acad.Sci.U S A 85, 6460-6464 (1988); Dranoff, et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U S A 90, 3539-3543 (1993))、アデノウイルスベクター (Wickham, T.J. et al., Cell 73, 309-319 (1993))などを用いる方法が用いられている。患者への投与法としては、骨髄移植、皮下注射、静脈注射などが用いられる (Asano, S., 蛋白質核酸酵素, 40, 2491-2495 (1995))。

また、本発明は、本発明の G タンパク質共役型レセプタータンパク質に結合する抗体に関する。本発明の G タンパク質共役型レセプタータンパク質に結合する抗体は、当業者に公知の方法 (例えば、「新生化学実験講座 1, タンパク質 I, 389-406, 東京化学同人」参照) により調製することが可能である。ポリクローナル抗体の調製は、例えば、以下の如く行う。ウサギ、モルモット、マウス、ニワトリなどの免疫動物に適量の上記タンパク質またはペプチドを投与する。投与は、抗体産生を促進するアジュバント (FIA や FCA) と共に行ってもよい。投与は、通常、数週間ごとに行う。免疫を複数回行うことにより、抗体価を上昇させることができる。最終免疫後、免疫動物から採血を行うことにより抗血清が得

られる。この抗血清に対し、例えば、硫酸アンモニウム沈殿や陰イオンクロマトグラフィーによる分画、プロテインAや固定化抗原を用いたアフィニティー精製を行うことにより、ポリクローナル抗体を調製することができる。一方、モノクローナル抗体の調製は、例えば、以下の如く行う。本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドを、上記と同様に免疫動物に免疫し、最終免疫後、この免疫動物から脾臓またはリンパ節を採取する。この脾臓またはリンパ節に含まれる抗体産生細胞とミエローマ細胞とをポリエチレングリコールなどを用いて融合し、ハイブリドーマを調製する。目的のハイブリドーマをスクリーニングし、これを培養し、その培養上清からモノクローナル抗体を調製することができる。モノクローナル抗体の精製は、例えば、硫酸アンモニウム沈殿や陰イオンクロマトグラフィーによる分画、プロテインAや固定化抗原を用いたアフィニティー精製により行うことができる。これにより調製された抗体は、本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質のアフィニティー精製のために用いられる他、本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質の発現異常に起因する疾患の検査や抗体治療、本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質の発現量の検出などに利用することが可能である。

抗体治療に用いる場合、ヒト型抗体もしくはヒト抗体であることが好ましい。ヒト型抗体は、例えば、マウス-ヒトキメラ抗体であれば、本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質に対する抗体を産生するマウス細胞から抗体遺伝子を単離し、そのH鎖定常部をヒト IgE H鎖定常部遺伝子に組換え、マウス骨髓腫細胞 J558L に導入することにより調製できる (Neuberger, M.S. et al., Nature 314, 268-270 (1985))。また、ヒト抗体は、免疫系をヒトと入れ換えたマウスに本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質を免疫することにより調製することができる。

また、本発明は、本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質に対するリガンドまたはそのアナログのスクリーニング方法に関する。このスクリーニ

ング方法においては、本発明の G タンパク質共役型レセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドに被検化合物を接触させ、これらタンパク質もしくはペプチドに結合する化合物を選択する工程を含む。被検化合物としては、例えば、アセチルコリン、アデノシン、アドレナリン、ノルアドレナリン、アンジオテンシン、ボムベシン、ブラジキニン、C5a アナフィラトキシン、カルシトニン、カナビノイド、ケモカイン、コレシストキニン、ドーパミン、エンドセリン、フォルミルメチオニルペプチド、GABA、ガラニン、グルカゴン、グルタミン酸、グリコペプチドホルモン、ヒスタミン、5-ヒドロキシトリプトファン、ロイコトリエン、メラノコルチン、神経ペプチド Y、ニューロテンシン、オドラント、オピオイドペプチド、オプシン、パラサイロイドホルモン、血小板活性化因子、プロスタノイド、ソマトスタチン、タキキニン、トロンビン、サイロトロビン放出ホルモン、バソプレシン、オキシトシン (Watson, S. and Arkinstall, S., The G-Protein Linked Receptor FactsBook, Academic Press (1994)) などの公知の化合物またはそのアナログ、その他の精製タンパク質、遺伝子 (ライブラリーも含む) の発現産物、リガンドが存在していることが予想される組織もしくは細胞の抽出液、細胞培養上清などが用いられる。スクリーニングに用いる本発明の G タンパク質共役型レセプタータンパク質は、例えば、所望の細胞 (該タンパク質を発現するように処理した形質転換体を含む) 内または細胞表面に発現した形態、該細胞の細胞膜画分としての形態、アフィニティーカラムに結合した形態であつてもよい。スクリーニングに用いる被検化合物は、必要に応じて適宜標識して用いられる。標識としては、例えば、放射標識、蛍光標識などが挙げられるが、これらに制限されない。本発明の G タンパク質共役型レセプタータンパク質と被検化合物との結合は、本発明の G タンパク質共役型レセプタータンパク質に結合した化合物に付された標識による検出 (例えば、結合量を放射活性や蛍光強度により検出する) のほか、被検化合物の細胞表面上の本発明の G タンパク質共役型レセプタータンパク質への結合による細胞内へのシグナル伝達 (例えば、G

タンパク質の活性化、Ca²⁺またはcAMPの濃度変化、ホスホリバーゼCの活性化、pHの変化)を指標に検出することもできる。具体的な方法については、例えば、文献 (Cell Calcium 14, 663-671 (1993)、Analytical Biochemistry 226, 349-354 (1995)、J.Biol.Chem. 268, 5957-5964 (1993)、Cell 92, 573-585 (1998)、Nature 393, 272-273 (1998)) や公報 (特開平9-268号公報) の記載に準じて行うことができる。その他、TWOハイブリッドシステム (Zervos et al., Cell 72, 223-232 (1994)、Fritz et al., Nature 376, 530-533 (1995)) を利用したレポーター遺伝子の活性の検出によっても結合を検出することができる。

また、本発明は、本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質とそのリガンドまたはリガンドのアナログとの結合を阻害する活性を有する化合物のスクリーニング方法に関する。このスクリーニング方法は、(a) 被検化合物の存在下で本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその部分ペプチドにリガンドまたはそのアナログを接触させ、該タンパク質またはその部分ペプチドとリガンドまたはそのアナログとの結合活性を検出する工程、および(b) 工程(a)で検出された結合活性を、被検化合物非存在下での結合活性と比較し、本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドとリガンドまたはそのアナログとの結合活性を低下させる化合物を選択する工程を含む。

被検化合物としては、タンパク質、ペプチド、非ペプチド性化合物、人工的に合成された化合物、組織や細胞の抽出液、血清などが挙げられるが、これらに制限されない。スクリーニングに用いる本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質は、例えば、所望の細胞 (該タンパク質を発現するように処理した形質転換体を含む) 内または細胞表面に発現した形態、該細胞の細胞膜画分としての形態、アフィニティカラムに結合した形態であってもよい。スクリーニングに利用するリガンドは必要に応じて適宜標識して用いられる。標識としては、例えば、放射標識、蛍光標識などが挙げられるが、これらに制限されない。また、

リガンドとしては、例えば、ヒスタミンを好適に用いることができる。また、ヒスタミンのアナログ、例えば、R(-)- α -メチルヒスタミンを用いることも可能である。

本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその部分ペプチドとリガンドまたはそのアナログとの結合活性は、本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質やその部分ペプチドに結合したリガンドまたはそのアナログに付された標識による検出（例えば、結合量を放射活性や蛍光強度により検出する）のほか、被検化合物の細胞表面上の本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質への結合による細胞の変化（例えば、Gタンパク質の活性化、Ca²⁺またはcAMPの濃度変化、ホスホリバーゼCの活性化、pHの変化）を指標に検出することもできる。具体的な方法については、例えば、実施例に記載のZlokarnikらの方法（Science 1998, vol.279, p.84）を利用することが可能である。また、文献（Cell Calcium 14, 663-671 (1993)、Analytical Biochemistry 226, 349-354 (1995)、J.Biol.Chem. 268, 5957-5964 (1993)、Cell 92, 573-585 (1998)、Nature 393, 272-273 (1998)）や公報（特開平9-268号公報）の記載に準じて行うことができる。検出の結果、被検化合物の存在下における結合活性が、被検化合物の非存在下における結合活性（対照）より低い値を示した場合には、該被検化合物は、本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその部分ペプチドとリガンドまたはそのアナログとの結合を阻害する活性を有すると判定される。このような化合物は、本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質に結合して細胞内へのシグナル伝達を誘導する活性を有する化合物（アゴニスト）および該活性を有しない化合物（アンタゴニスト）などが含まれる。アゴニストは、本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質に対するリガンドと同様の生理活性を有しており、一方、アンタゴニストは、本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質に対するリガンドが有する生理活性を抑制する。このため、これらアゴニストやアンタゴニストは、本発明のG

タンパク質共役型レセプタータンパク質を介したシグナル伝達系の異常などに起因する疾患の治療などのための医薬組成物として有用である。

また、本発明は、本発明の G タンパク質共役型レセプタータンパク質の活性を阻害または促進する化合物をスクリーニングする方法に関する。このスクリーニング方法は、(a) 被検化合物の存在下で本発明の G タンパク質共役型レセプタータンパク質を発現する細胞に該タンパク質のリガンドまたはそのアナログを接触させる工程、(b) 該リガンドまたはそのアナログの該タンパク質への結合による細胞における変化を検出する工程、および (c) 被検化合物非存在下での細胞における変化と比較して、工程 (b) で検出された細胞における変化を抑制または増強させる化合物を選択する工程、を含む方法である。

被検化合物としては、タンパク質、ペプチド、非ペプチド性化合物、人工的に合成された化合物、組織や細胞の抽出液、血清などが挙げられるが、これらに制限されない。上記の結合活性の阻害を指標としたスクリーニングにより単離された化合物を被検化合物として用いることも考えられる。本発明の G タンパク質共役型レセプタータンパク質を発現する細胞は、例えば、該タンパク質をコードする DNA を適当な発現ベクターに挿入し、該ベクターを適当な動物細胞に導入することにより調製することができる。該発現ベクターには、形質転換体を選別するためのマーカー遺伝子が挿入されていてもよい。本発明の G タンパク質共役型レセプタータンパク質を刺激するためのリガンドとしては、例えば、ヒスタミンを好適に用いることができる。また、ヒスタミンのアナログ、例えば、R (-)- α -メチルヒスタミンを用いることも可能である。

リガンドやそのアナログが本発明の G タンパク質共役型レセプタータンパク質へ結合することによる細胞における変化は、例えば、G タンパク質の活性化、Ca²⁺または cAMP の濃度変化、ホスホリバーゼ C の活性化、pH の変化を指標に検出することもできる。具体的な方法については、例えば、Zlokarnik らの方法 (Science 1998, vol.279, p.84) を利用することが可能である。また、文献

(Cell Calcium 14, 663-671 (1993)、Analytical Biochemistry 226, 349-354 (1995)、J.Biol.Chem. 268, 5957-5964 (1993)、Cell 92, 573-585 (1998)、Nature 393, 272-273 (1998)) や公報（特開平9-268号公報）の記載に準じて行うことができる。

この検出の結果、被検化合物非存在下においてリガンドやそのアナログを作用させた場合の細胞における変化と比較して、細胞における変化が抑制されれば、用いた被検化合物は、本発明の G タンパク質共役型レセプタータンパク質の活性を阻害する化合物であると判定される。逆に、被検化合物が該細胞における変化を増強されれば、該化合物は、本発明の G タンパク質共役型レセプタータンパク質の活性を促進する化合物であると判定される。

本発明のスクリーニング方法により単離される化合物（本発明のタンパク質のアゴニストやアンタゴニスト）は、例えば、関節リュウマチ、変形性関節症、胃潰瘍、炎症性腸疾患、虚血性心疾患、不整脈、高及び低血圧症、肥満、喘息、疼痛、アレルギー疾患、自己免疫疾患（Trends in Pharmacological Science, vol 19, 1998, 177-183, Stark, H. et al., Drugs of the Future 21, 507-520 (1996), Onodera, K. and Watanabe, T., Jpn.J.Psychopharmacol. 15, 87-102 (1995)）への応用が考えられる。これら化合物を薬剤として用いる場合には、単離された化合物自体を直接患者に投与する以外に、公知の製剤学的方法により製剤化した医薬組成物として投与を行うことも可能である。例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、結合剤、滑潤剤、甘味料、香料、および着色剤などと適宜組み合わせて製剤化して投与することが考えられる。患者への投与は、例えば、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射などのほか、鼻腔内的、経気管支的、筋内的、または経口的に当業者に公知の方法により行いうる。投与量は、患者の体重や年齢、投与方法などにより変動するが、当業者であれば適当な投与量を適宜選択することが可能である。

また、本発明は、本発明の G タンパク質共役型レセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドを含有することを特徴とする、上記本発明のスクリーニングのためのキットに関する。本発明のキットにおける本発明の G タンパク質共役型レセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドは、例えば、所望の細胞（該タンパク質を発現するように処理した形質転換体を含む）内または細胞表面に発現した形態、該細胞の細胞膜画分としての形態、アフィニティーカラムに結合した形態であってもよい。本発明のキットの他の要素としては、上記レセプタータンパク質標品以外に、例えば、リガンド標品（標識されたもの、および標識されていないもの）、リガンドとレセプタータンパク質の反応のための緩衝液、洗浄液などが含まれていてもよい。リガンドに付される標識としては、例えば、放射標識、蛍光標識などが挙げられる。本発明のキットの利用は、公報（特開平 9-268 号公報）の記載に準じて行うことができる。また、例えば、cAMP 濃度の変化の検出系や結合活性の検出系を利用したスクリーニングにおいて本発明のキットを利用することができる。

図面の簡単な説明

図 1 は、BG26 とヒスタミンレセプターH3 との整列を示す図である。

図 2 は、RT-PCR により各種組織における BG26 の発現を検出した結果を示す写真である。図中のレーン 1 から 32 はそれぞれ、脳、心臓、腎臓、肝臓、肺、臍臓、胎盤、骨格筋、結腸、卵巣、抹消血白血球、前立腺、小腸、脾臓、精巣、胸腺、胎児脳、胎児心臓、胎児腎臓、胎児肝臓、胎児肺、胎児骨格筋、胎児脾臓、胎児胸腺、胎児骨髓、胎児肝臓、リンパ節、抹消血白血球、脾臓、胸腺、扁桃腺、MilliQ 水（陰性対照）を示す。M は Takara 100 bp Ladder Marker(100bp, 200bp, 300bp, ..., 1000bp, 1500bp)を示す。

- 21 -

図3は、BG26とヒスタミンとの結合を検出した結果を示す図である。AはBG26を発現させた細胞、BはBG26を発現させない対照細胞での結果を示す。図中、三角は全結合活性を、四角は非特異的結合活性を、丸は特異的結合活性を示す。

図4は、BG26の発現による、細胞内cAMP濃度の変化を検出した結果を示す図である。図中、丸はpEF1X-BG26を導入した細胞での結果を、BはpEF1Xを導入した細胞（対照）での結果を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下に実施例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

[実施例1] 新規GPCR候補遺伝子の探索

既知のGPCRアミノ酸配列（約400個）の、GenBankのhigh throughput genomic divisionに対する類似性検索を行った。検索のアルゴリズムはblastを用いた。検索の結果得られた、既知のGPCRと類似性を示した配列をリストアップした。次いで、これらの塩基配列の、既知GPCRデータベースに対する類似性検索を行った。これら塩基配列が既知GPCRと同一か否か、同一でないのであればどの程度の類似性があるかを確認し、新規GPCR候補配列を得た。その候補配列の1つとして、AC007922 (GI:5230404)を見出した。

AC007922は11の断片配列からなり、そのうち2つの断片配列 (47924-77655、77656-114794) が、ヒスタミンレセプターH3と類似性を示した。この新規GPCR候補遺伝子を「BG26」と命名した。

[実施例2] BG26 cDNAのクローニング

blast検索では、AC007922塩基配列の中に、ヒスタミンレセプターH3の第2膜貫通領域よりN末端部位に対応する配列を見出せなかった。blast検索でヒスタミンレセプターH3と高い類似性が見出せた部分は、GenBank AC007922 (GI:5230404) の2箇所にあった。1箇所(108,428-108,598)はヒスタミンレセプターH3

の第2膜貫通領域の途中から第3膜貫通領域に相当し、もう1箇所(75,147-75,976)はヒスタミンレセプターH3の第4膜貫通領域からC末までに相当する。この2箇所は別々のコンティグ上にあり、8kb以上離れているので、間にイントロンが存在していることが予測された。

ヒスタミンレセプターH3のN末端部位に対応する配列を検出するため、より精度の高いfastaで検索を行なったところ、ヒスタミンレセプターH3の第1膜貫通領域からの第2膜貫通領域と類似する配列を検出することができた。この部分は、ヒスタミンレセプターH3の第2膜貫通領域の途中から第3膜貫通領域に類似する配列と同じコンティグの7.6kb上流に存在した。このため、この間にもう1つのイントロンが存在していることが予測された。

BG26 cDNAのクローニングを行なうために、まず、開始コドンの5'側および終始コドンの3'側の配列からオリゴヌクレオチドBG26S6 (TACTTGTCAAGAATTGTCTGGCTGGA／配列番号：3) およびBG26A7 (AGGGCAAGATAAAGGGCAGACCTGA／配列番号：4)を合成した。ヒト白血球cDNA (CLONETECH Multiple Tissue cDNA)から、プライマーBG26S6、BG26A7を用いて、PCRによりBG26 cDNAを増幅した。PCRは、Takara ExTaqのプロトコールに従い、94°C1分の後、94°C10秒、68°C3分を35サイクル、最後に68°C3分を行なった。

次いで、増幅産物をプラスミド・ベクターpCR2.1 (Invitrogen社)にクローニングした (pCR-BG26)。

ダイプライマーサイクルシーケンシングキットFS (PEバイオシステムズ社)とダイターミネーターサイクルシーケンシングキットFS (PEバイオシステムズ社)でダイオキシシーケンシング反応を行ない、DNAシーケンサー377 (PEバイオシステムズ社)で電気泳動して塩基配列を決定した。アミノ酸配列の推定には、LASERGENE (DNAスター社)を用いた。

タンパク質の推定アミノ酸配列は390残基からなり、最も高い相同性を示したヒスタミンレセプターH3とは、相同性は40%であった(図1)。

- 23 -

なお、BG26 cDNA をクローニングした大腸菌株 (E. coli hBG26) を下記の通り寄託した。

(イ) 寄託機関の名称・あて名

名称：通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

あて名：日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号（郵便番号305-8566）

(ロ) 寄託日（原寄託日）：平成11年12月3日

(ハ) 寄託番号：生命研条寄第7339号 (FERM BP 7339)

[実施例3] BG26 の発現解析

ノーザンハイブリダイゼーションでは BG26 の転写産物は検出されなかつた。そこで、Multiple Tissue cDNA Panel (CLONETECH 社) を用いた RT-PCR を実施した。プライマーには、BG26S2 (CATTGTCCTCATCAGCTATGATC／配列番号：5) および BG26A1 (AGCGCTTGTGACACAATGGATAC／配列番号：6) を用いた。PCR 反応は、[7.4 μl の H₂O、1 μl の 10 x ExTaq バッファー、0.1 μl の各 2.5mM dNTP、0.2 μl の 10 μM BG26S2、0.1 μl の 10 μM BG26A1、0.1 μl の ExTaq、1 μl の cDNA] を含む反応液中で、94°Cで1分、「94°Cで15秒、57°Cで10秒、72°Cで50秒」を35サイクル、72°Cで10分の反応時間で行なつた。その結果、BG26 は、心臓、腎臓、肝臓、肺臓、胎盤、骨格筋、抹消血白血球、前立腺、小腸、脾臓、精巣、骨髓、リンパ節で検出され、脳、結腸、卵巣、胸腺、扁桃腺では検出されなかつた（図2）。

[実施例4] BG26 の細胞へのトランスフェクション

pCR-BG26 を制限酵素 EcoRV、BamHI で消化し、BG26 cDNA 断片を精製後、EcoRV、BamHI で消化したプラスマド・ベクター pKT にライゲーションした (pKT-BG26)。さらに、pKT-BG26 を EcoRV、SphI で消化し、BG26 cDNA 断片を精製後、EcoRV、XbaI で消化した pEF1x (Biochem. Biophys. Res. Commun., 250, 68-71) にライゲーションした。これにより構築された BG26 発現ベクターを「pEF1x-BG26」と命名した。

この pEF1X-BG26 を、 COS7 細胞 (Aurora 社より購入) にリポフェクション法により導入した。導入には Lipofectamine PLUS reagent (GIBCO-BRL 社) を用い、実験操作は添付のマニュアルに従った。

得られた形質転換体は、 10% となるように牛胎児血清 (シグマ社) を添加したダルベッコ MEM 培地 (旭テクノガラス社) で、 5% 二酸化炭素となるよう調整したインキュベーター中で 37 度で 24 時間培養し、 ヒスタミン結合実験のための膜画分の調製に用いた。

[実施例 5] ヒスタミン結合解析

pEF1X-BG26 もしくは BG26 遺伝子を持たない対照ベクター pEF1X をトランスフェクションした COS7 細胞を 50mM Tris-HCl 溶液 (pH7.4) 中で定法に従い破碎し、 1000g で 10 分間遠心し、 未破碎細胞を除去後、 上清を 100,000g で 10 分間遠心し、 膜画分を得た。再度、 膜画分を 50mM Tris-HCl 溶液 (pH7.4) に懸濁し、 100,000g で 10 分、 2 回遠心し、 最終的に膜画分を得た。こうして得られた画分を 50 mM Tris-HCl 溶液 (pH7.4) に懸濁し、 結合実験に用いた。

ヒスタミンアナログアゴニストである、 N- α -メチルヒスタミンを用いて、 結合実験を行った。上記膜画分を 50mM Tris-HCl pH7.4 溶液中で 2nM [3 H]N- α -メチルヒスタミン (NEN 社) と 30 度で 40 分間保温し、 あらかじめ 0.5% ポリエチレンイミン (和光社) で処理した Unifilter plate GF/C (パッカード社) で細胞を収集した。非特異的な細胞へのヒスタミンアナログの結合は、 2 μ M N- α -メチルヒスタミン (RBI 社) 共存下で測定した。その結果、 BG26 を発現していないコントロール細胞では、 N- α -メチルヒスタミンの特異的な結合は観察されなかったが (図 3 B) 、 BG26 を発現した細胞では、 膜画分用量依存的に N- α -メチルヒスタミンの特異的結合が上昇した (図 3 A) 。このことから、 BG26 レセプターは特異的に、 ヒスタミンアナログと結合することが示された。

[実施例 6] 細胞内 cAMP 測定のための BG26 のトランスフェクション

- 25 -

HEK293/CRE-BLA細胞 (Aurora 社) は、10%牛胎児血清を含む D-MEM/F-12(1:1)混合培地 (GIBCO BRL 社) を用い、37°C、5%CO₂存在下で培養した。遺伝子導入には、Effectene™ Transfection Reagent (QIAGEN 社) を用いた。

トランスフェクションの前日に、2x10⁶ の細胞を 100mm シャーレに蒔き、60μl の Effectene™ Transfection Reagent を用いて、2μg の BG26 発現ベクター-pEF1X-BG26 及び、対照ベクター-pEF1X をトランスフェクションした。37°Cで 18 時間インキュベーションした後、トランスフェクションした細胞をトリプシンを用いてシャーレから剥がし、ポリ-L-リジンコートされた 24 ウェルプレート (SUMIRON 社) に 2.5x10⁴ 細胞/ウェルになるように蒔き直し、さらに 37°Cで 24 時間インキュベーションした。

トランスフェクションした細胞は、血清を含まない D-MEM/F-12(1:1)混合培地で 37°Cで 15 分インキュベーション、さらに、5mM 3-Isobutyl-1-Methylxanthine (IBMX) を含む D-MEM/F-12(1:1)混合培地で、37°Cで 15 分インキュベーションした。10μM の Forskolin 存在下あるいは非存在下でヒスタミンを添加し、37°Cで 15 分インキュベーションした後、細胞内 cAMP の測定を行った。

細胞内 cAMP の測定には、cyclic AMP enzymeimmunoassay (EIA) system (アマシャム ファルマシア バイオテク社) を用い、添付のマニュアルに従って行った。この時、1 ウェル当り Lysis Buffer 200μl で細胞を溶解し、この細胞抽出液 20μl を用いて cAMP の測定を行った。

その結果、BG26 を発現していない対照ベクター-pEF1X をトランスフェクションした細胞では、細胞内 cAMP の変動は検出されなかったのに対して、BG26 を発現した細胞では、10μM Forskolin 存在下において、ヒスタミン濃度に依存的な cAMP の減少が確認された (図4)。このことから、BG26 レセプターは、Gαi に具役しヒスタミン特異的に cAMP を減少させることが判明した。

- 2 6 -

本発明により、ヒスタミンに結合する新規な G タンパク質共役型レセプター タンパク質およびその遺伝子が提供された。これにより該レセプタータンパク質を利用したリガンドや医薬品の候補化合物のスクリーニングが可能となった。これらリガンドや医薬品の候補化合物は、例えば、本発明の G タンパク質共役型 レセプタータンパク質を介したシグナル伝達系の異常などに起因する疾患の診断 や治療などへの利用が期待される。

請求の範囲

1. 下記 (a) から (d) のいずれかに記載のケアノシン三リン酸結合タンパク質共役型のレセプタタンパク質をコードする DNA。
 - (a) 配列番号：2 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする DNA。
 - (b) 配列番号：1 に記載の塩基配列のコード領域を含む DNA。
 - (c) 配列番号：2 に記載のアミノ酸配列において 1 もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入されたアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする DNA。
 - (d) 配列番号：1 に記載の塩基配列からなる DNA とストリンジエントな条件下でハイブリダイズする DNA。
2. ヒスタミンとの結合活性を有するタンパク質をコードする、請求項 1 に記載の DNA。
3. ヒスタミン刺激に応答して細胞内の cAMP 濃度を変化させる活性を有するタンパク質をコードする、請求項 1 に記載の DNA。
4. 配列番号：2 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質の部分ペプチドをコードする DNA。
5. 請求項 1 から 4 のいずれかに記載の DNA を含有することを特徴とするベクター。
6. 請求項 1 から 4 のいずれかに記載の DNA または請求項 5 に記載のベクターを保持する形質転換体。
7. 請求項 1 から 4 のいずれかに記載の DNA によりコードされるタンパク質またはペプチド。
8. 請求項 6 に記載の形質転換体を培養し、発現させたタンパク質又はペプチドを回収する工程を含む、請求項 7 に記載のタンパク質またはペプチドの製造方法。

9. 請求項7に記載のタンパク質に結合するリガンドまたはそのアナログのスクリーニング方法であって、

(a) 請求項 7 に記載のタンパク質またはペプチドに被検化合物を接触させる工程、

(b) 該タンパク質またはペプチドに結合する化合物を選択する工程、を含む方法。

10. 請求項7に記載のタンパク質とそのリガンドまたは該リガンドのアナログとの結合を阻害する活性を有する化合物のスクリーニング方法であって、

(a) 被検化合物の存在下で請求項7に記載のタンパク質またはペプチドにリガンドまたはそのアナログを接触させ、該タンパク質またはペプチドとリガンドまたはそのアナログとの結合活性を検出する工程、

(b) 被検化合物非存在下での結合活性と比較して、工程 (a) で検出された結合活性を低下させる化合物を選択する工程、を含む方法。

11. リガンドがヒスタミンである、請求項10に記載の方法。

12. 請求項7に記載のタンパク質の活性を阻害または促進する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 被検化合物の存在下で該タンパク質を発現する細胞に該タンパク質のリガンドまたはそのアナログを接触させる工程、

(b) 該リガンドまたはそのアナログの該タンパク質への結合による細胞における変化を検出する工程、

(c) 被検化合物非存在下での細胞における変化と比較して、工程 (b) で検出された細胞における変化を抑制または増強させる化合物を選択する工程、を含む方法。

13. リガンドがヒスタミンである、請求項12に記載の方法。

- 2 9 -

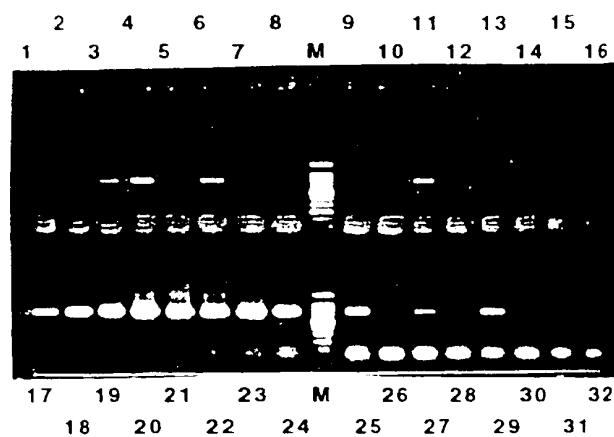
14. 検出する細胞における変化が、cAMP 濃度の変化、カルシウム濃度の変化、G タンパク質の活性化、ホスホリバーゼ C の活性化、および pH の変化からなる群より選択される、請求項 12 または 13 に記載の方法。
15. 請求項 7 に記載のタンパク質またはペプチドを含有することを特徴とする、請求項 9 から 14 のいずれかのスクリーニングのためのキット。
16. 請求項 7 に記載のタンパク質に結合する抗体。
17. 請求項 10 から 14 のいずれかに記載のスクリーニングにより単離される化合物。
18. 請求項 17 に記載の化合物を有効成分とする医薬組成物。

1

		10	20	30	40
BG26		MPDTNSTINLSLSTRVTLAFFMSLVAFAIMLGNALVILAFV			
H3	MERAPPDGPLNASGALAGEAAAAGGARGFSAAWTAVLAALMALLIVATVLGNALVMLAFV				
	10 20 30 40 50 60				
BG26	VDKNLHRSSYFFLNLASI SDFF VGVISIPLYIPHTLF-EWDFGKEICVFWLTTDYLLCTA	50	60	70	80
H3	ADSSLRTQNNFLLNLASI DFL VGAFCIPLYVPYVLTGRWTFGRGLCKLWLVDYLLCTS	70	80	90	100
BG26	SVYNIVLISYDRYLSVSNAVSYRTQHTGVLKIVTLMVAVVVLAFLVNGPMILVSESWK--	110	120	130	140
H3	SAFNIVLISYDRFLSVTRAVSYRAQQGDTRRAVRKMLLVWVLAFLLYGPAIL--SWEYL	130	140	150	160
BG26	DEGS----ECEPGFFSEWYILAITSFLEFVIPVILVAYFNMNIY-----	160	170	180	190
H3	SGGSSIPEGHCYAEFFYNWYFLITASTLEFFTPFLSVTFNL S YLN I QRRTRLRLDGAR	180	190	200	210
BG26	-----WSLWKRDHLSRCQSHP---GLTAVSSNICGHSFRGRGLSS	200	210	220	230
H3	EAAGPEPPPEAQPSPPPPGCWGCWQKGHEAMPLHRYGVGEAAVGAEA-GEATLGGGGG	240	250	260	270
BG26	RRSLSASTEV P ASFH S ERQRRKSSLMFSSRTKMNSNTIAS K MGSFSQSDSVALHQREHVE	240	250	260	270
H3	GGSVASPTSSSGS-SSRGTERPRSLKRGSKPSASSASLEKRMKMVSQS---FTQR--FR	300	310	320	330
BG26	LLRARRLAKSLAILLGFAVCWAPYSLFTIVLSFYSSATGPKVWYRIAFWLQWFNSFVN	300	310	320	330
H3	LSRDRKVAKSLAVIVSIFGLCWAPY T LLMI I RAACHGHCV P -DYWYETSF W LLWANS A V N	350	360	370	380
BG26	340 350 360 370 380 390				
H3	PLLYPLCHKRFQKAFLKIFCIKK---QPLPSQHSRSVSS	360	370	380	390
BG26	PVLYPLCHHSFRAFTKLLCPQKLKIQPHSSLEHCWKKMKKKTCL	410	420	430	440
H3		450			

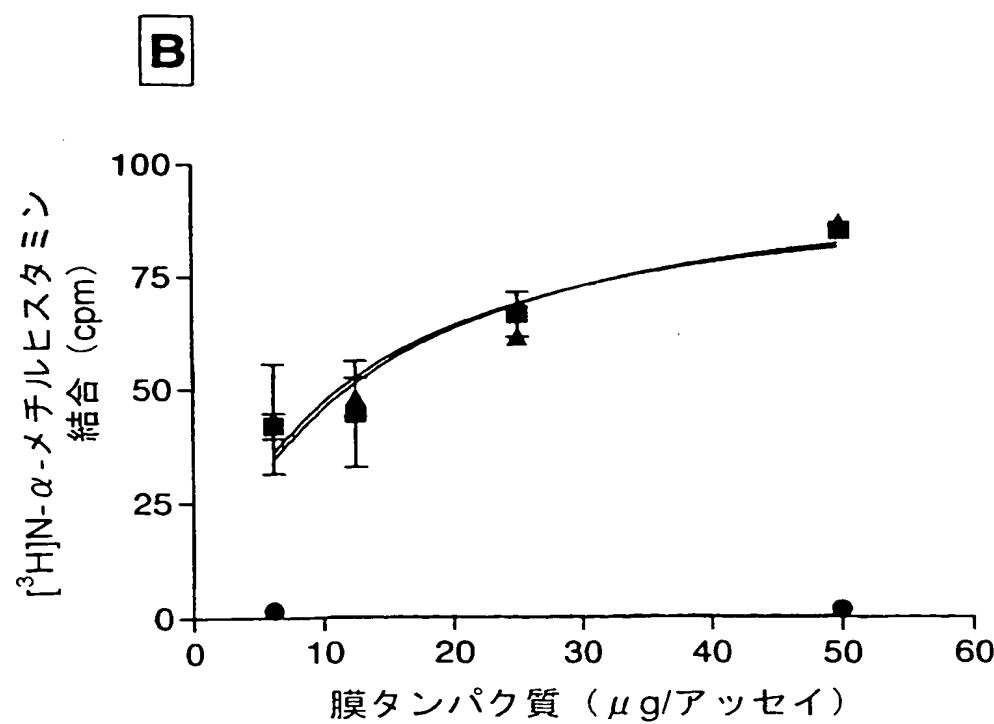
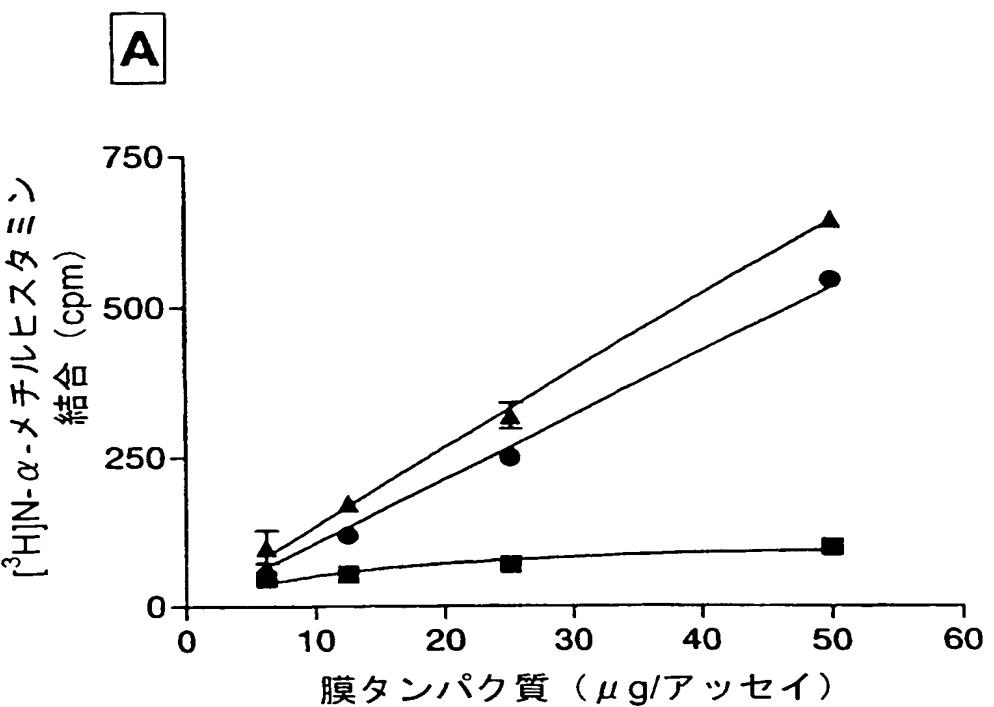
2 / 4

図 2



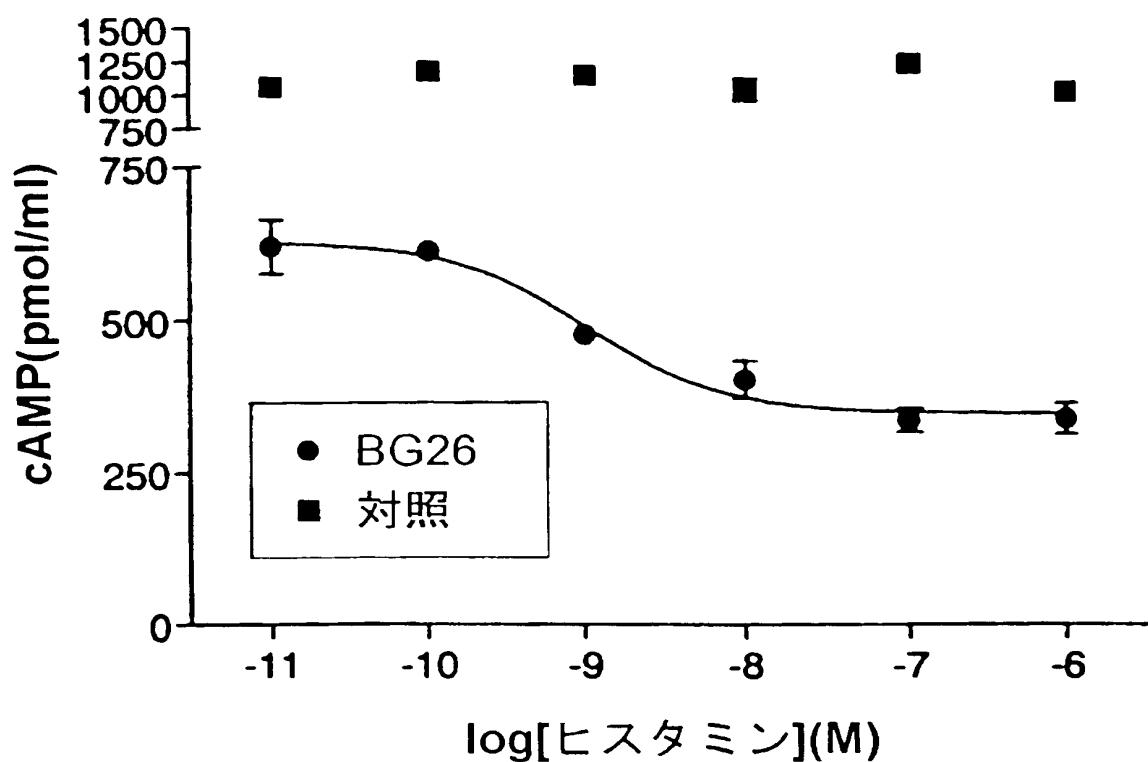
3 / 4

図 3



4 / 4

図 4



1 / 1 1

SEQUENCE LISTING

<110> BANYU PHARMACEUTICAL CO., LTD.

<120> G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR, BG26

<130> B1-104PCT

<140>

<141>

<150> JP 1999-361687

<151> 1999-12-20

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1312

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

2 / 1 1

<222> (64)..(1233)

<400> 1

tacttgcag aattgtctgg ctggattat ttgctaattt gaccccttc atcatttgat 60

gtg atg cca gat act aat agc aca atc aat tta tca cta agc act cgt 108

Met Pro Asp Thr Asn Ser Thr Ile Asn Leu Ser Leu Ser Thr Arg

1

5

10

15

gtt act tta gca ttt ttt atg tcc tta gta gct ttt gct ata atg cta 156

Val Thr Leu Ala Phe Phe Met Ser Leu Val Ala Phe Ala Ile Met Leu

20

25

30

gga aat gct ttg gtc att tta gct ttt gtg gtg gac aaa aac ctt aga 204

Gly Asn Ala Leu Val Ile Leu Ala Phe Val Val Asp Lys Asn Leu Arg

35

40

45

cat cga agt agt tat ttt ttt ctt aac ttg gcc atc tct gac ttc ttt 252

His Arg Ser Ser Tyr Phe Phe Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asp Phe Phe

50

55

60

gtg ggt gtg atc tcc att cct ttg tac atc cct cac aeg ctg ttc gaa 300

Val Gly Val Ile Ser Ile Pro Leu Tyr Ile Pro His Thr Leu Phe Glu

65

70

75

tgg gat ttt gga aag gaa atc tgt gta ttt tgg ctc act act gac tat 348

3 / 1 1

Trp Asp Phe Gly Lys Glu Ile Cys Val Phe Trp Leu Thr Thr Asp Tyr
80 85 90 95

ctg tta tgt aca gca tct gta tat aac att gtc ctc atc agc tat gat 396
Leu Leu Cys Thr Ala Ser Val Tyr Asn Ile Val Leu Ile Ser Tyr Asp
100 105 110

cga tac ctg tca gtc tca aat gct gtg tct tat aga act caa cat act 444
Arg Tyr Leu Ser Val Ser Asn Ala Val Ser Tyr Arg Thr Gln His Thr
115 120 125

ggg gtc ttg aag att gtt act ctg atg gtg gcc gtt tgg gtg ctg gcc 492
Gly Val Leu Lys Ile Val Thr Leu Met Val Ala Val Trp Val Leu Ala
130 135 140

ttc tta gtg aat ggg cca atg att cta gtt tca gag tct tgg aag gat 540
Phe Leu Val Asn Gly Pro Met Ile Leu Val Ser Glu Ser Trp Lys Asp
145 150 155

gaa ggt agt gaa tgt gaa cct gga ttt ttt tcg gaa tgg tac atc ctt 588
Glu Gly Ser Glu Cys Glu Pro Gly Phe Phe Ser Glu Trp Tyr Ile Leu
160 165 170 175

gcc atc aca tca ttc ttg gaa ttc gtg atc cca gtc atc tta gtc gct 636
Ala Ile Thr Ser Phe Leu Glu Phe Val Ile Pro Val Ile Leu Val Ala
180 185 190

4 / 1 1

tat ttc aac atg aat att tat tgg agc ctg tgg aag cgt gat cat ctc 684
Tyr Phe Asn Met Asn Ile Tyr Trp Ser Leu Trp Lys Arg Asp His Leu

195 200 205

agt agg tgc caa agc cat cct gga ctg act gtc tct tcc aac atc 732
Ser Arg Cys Gln Ser His Pro Gly Leu Thr Ala Val Ser Ser Asn Ile
210 215 220

tgt gga cac tca ttc aga ggt aga cta tct tca agg aga tet ctt tct 780
Cys Gly His Ser Phe Arg Gly Arg Leu Ser Ser Arg Arg Ser Leu Ser
225 230 235

gca tcg aca gaa gtt cct gca tcc ttt cat tca gag aga cag agg aga 828
Ala Ser Thr Glu Val Pro Ala Ser Phe His Ser Glu Arg Gln Arg Arg
240 245 250 255

aag agt agt ctc atg ttt tcc tca aga acc aag atg aat agc aat aca 876
Lys Ser Ser Leu Met Phe Ser Ser Arg Thr Lys Met Asn Ser Asn Thr
260 265 270

att get tcc aaa atg ggt tcc ttc tcc caa tca gat tet gta get ctt 924
Ile Ala Ser Lys Met Gly Ser Phe Ser Gln Ser Asp Ser Val Ala Leu
275 280 285

cac caa agg gaa cat gtt gaa ctg ctt aga gcc agg aga tta gcc aag 972

5 / 1 1

His Gln Arg Glu His Val Glu Leu Leu Arg Ala Arg Arg Leu Ala Lys

290

295

300

tca ctg gcc att ctc tta ggg gtt ttt gct gtt tgc tgg gct cca tat 1020

Ser Leu Ala Ile Leu Leu Gly Val Phe Ala Val Cys Trp Ala Pro Tyr

305

310

315

tct ctg ttc aca att gtc ctt tca ttt tat tcc tca gca aca ggt cct 1068

Ser Leu Phe Thr Ile Val Leu Ser Phe Tyr Ser Ser Ala Thr Gly Pro

320

325

330

335

aaa tca gtt tgg tat aga att gca ttt tgg ctt cag tgg ttc aat tcc 1116

Lys Ser Val Trp Tyr Arg Ile Ala Phe Trp Leu Gln Trp Phe Asn Ser

340

345

350

ttt gtc aat cct ctt ttg tat cca ttg tgt cac aag cgc ttt caa aag 1164

Phe Val Asn Pro Leu Leu Tyr Pro Leu Cys His Lys Arg Phe Gln Lys

355

360

365

gct ttc ttg aaa ata ttt tgt ata aaa aag caa cct cta cca tca caa 1212

Ala Phe Leu Lys Ile Phe Cys Ile Lys Lys Gln Pro Leu Pro Ser Gln

370

375

380

cac agt cgg tca gta tct tct taaagacaat tttctcacct ctgtaaat 1263

His Ser Arg Ser Val Ser Ser

385

390

6 / 1 1

tagtctcaat ctcacctaaa tgaatcaggt ctgcacctta tcttgcacct 1312

<210> 2

<211> 390

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Pro Asp Thr Asn Ser Thr Ile Asn Leu Ser Leu Ser Thr Arg Val

1

5

10

15

Thr Leu Ala Phe Phe Met Ser Leu Val Ala Phe Ala Ile Met Leu Gly

20

25

30

Asn Ala Leu Val Ile Leu Ala Phe Val Val Asp Lys Asn Leu Arg His

35

40

45

Arg Ser Ser Tyr Phe Phe Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asp Phe Phe Val

50

55

60

Gly Val Ile Ser Ile Pro Leu Tyr Ile Pro His Thr Leu Phe Glu Trp

65

70

75

80

Asp Phe Gly Lys Glu Ile Cys Val Phe Trp Leu Thr Thr Asp Tyr Leu

85

90

95

7 / 1 1

Leu Cys Thr Ala Ser Val Tyr Asn Ile Val Leu Ile Ser Tyr Asp Arg

100 105 110

Tyr Leu Ser Val Ser Asn Ala Val Ser Tyr Arg Thr Gln His Thr Gly

115 120 125

Val Leu Lys Ile Val Thr Leu Met Val Ala Val Trp Val Leu Ala Phe

130 135 140

Leu Val Asn Gly Pro Met Ile Leu Val Ser Glu Ser Trp Lys Asp Glu

145 150 155 160

Gly Ser Glu Cys Glu Pro Gly Phe Phe Ser Glu Trp Tyr Ile Leu Ala

165 170 175

Ile Thr Ser Phe Leu Glu Phe Val Ile Pro Val Ile Leu Val Ala Tyr

180 185 190

Phe Asn Met Asn Ile Tyr Trp Ser Leu Trp Lys Arg Asp His Leu Ser

195 200 205

Arg Cys Gln Ser His Pro Gly Leu Thr Ala Val Ser Ser Asn Ile Cys

210 215 220

Gly His Ser Phe Arg Gly Arg Leu Ser Ser Arg Arg Ser Leu Ser Ala

8 / 1 1

225 230 235 240

Ser Thr Glu Val Pro Ala Ser Phe His Ser Glu Arg Gln Arg Arg Lys

245 250 255

Ser Ser Leu Met Phe Ser Ser Arg Thr Lys Met Asn Ser Asn Thr Ile

260 265 270

Ala Ser Lys Met Gly Ser Phe Ser Gln Ser Asp Ser Val Ala Leu His

275 280 285

Gln Arg Glu His Val Glu Leu Leu Arg Ala Arg Arg Leu Ala Lys Ser

290 295 300

Leu Ala Ile Leu Leu Gly Val Phe Ala Val Cys Trp Ala Pro Tyr Ser

305 310 315 320

Leu Phe Thr Ile Val Leu Ser Phe Tyr Ser Ser Ala Thr Gly Pro Lys

325 330 335

Ser Val Trp Tyr Arg Ile Ala Phe Trp Leu Gln Trp Phe Asn Ser Phe

340 345 350

Val Asn Pro Leu Leu Tyr Pro Leu Cys His Lys Arg Phe Gln Lys Ala

355 360 365

9 / 1 1

Phe Leu Lys Ile Phe Cys Ile Lys Lys Gln Pro Leu Pro Ser Gln His

370

375

380

Ser Arg Ser Val Ser Ser

385

390

<210> 3

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 3

TACTTGTAG AATTGTCTGG CTGGA

25

<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

1 0 / 1 1

<400> 4

AGGGCAAGAT AAAGGGCAGA CCTGA

25

<210> 5

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 5

CATTGTCCTC ATCAGCTATG ATC

23

<210> 6

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 6

1 1 / 1 1

AGCGCTTGTG ACACAATGGA TAC

23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/09038

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 Int.Cl' C12N15/12, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C07K14/705,
 C12P21/02, C12Q1/02, C07K16/28

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl' C12N15/12, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C07K14/705,
 C12P21/02, C12Q1/02, C07K16/28

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), JICST FILE (JOIS),
 SwissProt/PIR/GeneSeq, GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO, 99/33978, A1 (BANYU PHARMACEUTICAL CO., LTD.), 08 July, 1999 (08.07.99) & AU, 9916910, A & EP, 1043395, A1	1-16
Y	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.88, (1991), Ira Ganz, et al., "Molecular cloning of a gene encoding the histamine H2 receptor", p.429-433	1-16
P, X	WO, 00/22131, A2 (ARENA PHARMACEUTICALS, INC.), 20 April, 2000 (20.04.00) (Family: none)	1-16
P, X	WO, 00/31258, A2 (ARENA PHARMACEUTICALS, INC.), 02 June, 2000 (02.06.00) (Family: none)	1-16
A	Molecular Pharmacology, Vol.55, (June 1999), Lovenberg TW, et al., "Cloning and functional expression of the human histamine H3 receptor", p.1101-1107	1-16

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

• Special categories of cited documents:	
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E"	earlier document but published on or after the international filing date
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X"	document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y"	document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&"	document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
 07 March, 2001 (07.03.01)

Date of mailing of the international search report
 21 March, 2001 (21.03.01)

Name and mailing address of the ISA/
 Japanese Patent Office

Authorized officer

Faxsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/09038

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: 17-18
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

Concerning "compound" and "medicinal composition containing said compound as the active ingredient" in the above-described claims, the description merely states a general method for isolating a substance inhibiting or promoting the activity of the protein according to the invention. Namely, no particular compound is disclosed therein. Such being the case, it is unknown what particular substances are involved in the scope of the above "compound". Thus, the above claims are extremely unclear. Therefore, no meaningful international search can be performed on the above claims.
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPOO/09038

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12N15/12, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C07K14/705, C12P21/02, C12Q1/02, C07K16/28

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12N15/12, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C07K14/705, C12P21/02, C12Q1/02, C07K16/28

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALOG), JICST/バイ(JOIS),
SwissProt/PIR/GeneSeq, GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び 一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO, 99/33978, A1 (BANYU PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 8.7月. 1999 (08. 07. 99) &AU, 9916910, A &EP, 1043395, A1	1-16
Y	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 88, (1991), Ira Ganz, et al., "Molecular cloning of a gene encoding the histamine H2 receptor", p. 429-433	1-16
P, X	WO, 00/22131, A2 (ARENA PHARMACEUTICALS, INC.) 20.4月. 2000 (20. 04. 00) (ファミリーなし)	1-16

[X] C欄の続きにも文献が列挙されている。

 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「I」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07. 03. 01

国際調査報告の発送日

21.03.01

国際調査機関の名称及び先

日本特許庁 (ISA) J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関二丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

北村 弘樹

印

4 B 2936

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP00/09038

C (続き) 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
P, X	WO, 00/31258, A2 (ARENA PHARMACEUTICALS, INC.) 2.6月. 2000 (02.06.00) (ファミリーなし)	1-16
A	Molecular Pharmacology, Vol. 55, (June 1999), Lovenberg TW, et al., "Cloning and functional expression of the human histamine H3 receptor", p.1101-1107	1-16